

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 28 374.5  
**Anmeldetag:** 25. Juni 2002  
**Anmelder/Inhaber:** Leica Microsystems Heidelberg  
GmbH, Mannheim/DE  
**Bezeichnung:** Verfahren zur Mikroskopie und  
Mikroskop  
**IPC:** G 02 B, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. März 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

J00001

A 9161  
08/00  
EDV-L

### Verfahren zur Mikroskopie und Mikroskop

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Mikroskopie und insbesondere ein Verfahren zur Mikroskopie, wobei eine Probe mit gepulstem Beleuchtungslicht, das Licht aus einem Spektralbereich aufweist, beleuchtet wird und von der Probe ausgehendes Detektionslicht in einem Detektionsspektralbereich detektiert wird.

Außerdem betrifft die Erfindung ein Mikroskop mit einer Lichtquelle zur Erzeugung von gepulstem Beleuchtungslicht, das Licht aus einem Spektralbereich aufweist, und mit mindestens einem Detektor zum Detektieren des von einer Probe ausgehenden Detektionslichtes in einem Detektionsspektralbereich.

Zur Untersuchung von biologischen Proben ist es seit langem üblich, die Probe mit optischen Markern, insbesondere mit Fluoreszenzfarbstoffen zu präparieren. Oft werden, beispielsweise im Bereich der Genuntersuchungen, mehrere unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe in die Probe eingebracht, die sich spezifisch an bestimmten Probenbestandteilen anlagern. Aus den Fluoreszenzeigenschaften der präparierten Probe können beispielsweise Rückschlüsse auf die Beschaffenheit, die Zusammensetzung der Probe oder auf Konzentrationen bestimmter Stoffe innerhalb der Probe gezogen werden.

Insbesondere in der Scanmikroskopie werden Verfahren verwendet, die ortsabhängige Nichtlinearitäten der Probe ausnutzen. Zu diesem Bereich gehört beispielsweise „Coherent Anti Stokes Raman Scattering“ (CARS), das u.a. aus der PCT-Anmeldung WO 0200004352 A1 bekannt ist. Allerdings ist anzumerken, dass für dieses Verfahren Beleuchtungslicht mit mindestens zwei unterschiedlichen Beleuchtungslichtwellenlängen bei hohen Lichtleistungen erforderlich ist.

Ein anderes Verfahren, das sich nichtlineare Effekte zu nutzen macht ist die sog. STED-Mikroskopie (STED: Stimulated Emission Depletion), die beispielsweise aus PCT/DE/95/00124 bekannt ist. Hierbei werden die lateralen Randbereiche des Fokusvolumens des Anregungslichtstrahls mit  
5 einem Lichtstrahl einer anderen Wellenlänge, dem sog. Stimulationslichtstrahl, der von einem zweiten Laser emittiert wird, beleuchtet, um dort die vom Licht des ersten Lasers angeregten Probenbereiche stimuliert in den Grundzustand zurück zu bringen. Detektiert wird dann nur das spontan emittierte Licht aus den nicht vom zweiten Laser beleuchteten Bereichen, so daß insgesamt eine  
10 Auflösungsverbesserung erreicht wird.

In der Mehrphotonen-Scanmikroskopie werden die Fluoreszenzphotonen detektiert, die auf einen Zwei- oder Mehrphotonenanregungsprozess zurückzuführen sind. Die Wahrscheinlichkeit eines Zwei-Photonenüberganges ist vom Quadrat der Anregungslichtleistung abhängig und findet daher mit  
15 großer Wahrscheinlichkeit im Fokus des abtastenden Beleuchtungslichtstrahles statt, da dort die Leistungsdichte am höchsten ist. Um ausreichend hohe Lichtleistungen zu erzielen, ist es zweckmäßig, das Beleuchtungslicht zu pulsen und so hohe Pulsspitzenleistungen zu erreichen. Diese Technik ist bekannt und beispielsweise in der amerikanischen  
20 Patenschrift US 5,034,613 „Two-photon laser microscopy“ und in der deutschen Offenlegungsschrift DE 44 14 940 offenbart. Ein weiterer Vorteil der Mehrphotonenanregung insbesondere in der konfokalen Scanmikroskopie liegt im verbesserten Bleichverhalten; da die Probe nur im Bereich ausreichender Leistungsdichte, also im Fokus eines  
25 Beleuchtungslichtstrahles, ausbleicht. Außerhalb dieses Bereichs findet im Gegensatz zur Ein-Photonen-Anregung nahezu kein Bleichen statt.

In der Scanmikroskopie wird eine Probe mit einem Lichtstrahl beleuchtet, um das von der Probe emittierte Reflexions- oder Fluoreszenzlicht zu beobachten. Der Fokus eines Beleuchtungslichtstrahles wird mit Hilfe einer steuerbaren  
30 Strahlableitvorrichtung, im Allgemeinen durch Verkippen zweier Spiegel, in einer Objektebene bewegt, wobei die Ablenkachsen meist senkrecht aufeinander stehen, so dass ein Spiegel in x-, der andere in y-Richtung

ablenkt. Die Verkipfung der Spiegel wird beispielsweise mit Hilfe von Galvanometer-Stellelementen bewerkstelligt. Die Leistung des vom Objekt kommenden Lichtes wird in Abhängigkeit von der Position des Abtaststrahles gemessen. Üblicherweise werden die Stellelemente mit Sensoren zur  
5 Ermittlung der aktuellen Spiegelstellung ausgerüstet.

Speziell in der konfokalen Scanmikroskopie wird ein Objekt mit dem Fokus eines Lichtstrahles in drei Dimensionen abgetastet.

Ein konfokales Rastermikroskop umfasst im Allgemeinen eine Lichtquelle, eine Fokussieroptik, mit der das Licht der Quelle auf eine Lochblende – die  
10 sog. Anregungsblende - fokussiert wird, einen Strahlteiler, eine Strahlablenkeinrichtung zur Strahlsteuerung, eine Mikroskopoptik, eine Detektionsblende und die Detektoren zum Nachweis des Detektions- bzw. Fluoreszenzlichtes. Das Beleuchtungslicht wird über einen Strahlteiler eingekoppelt. Das vom Objekt kommende Fluoreszenz- oder Reflexionslicht  
15 gelangt über die Strahlablenkeinrichtung zurück zum Strahlteiler, passiert diesen, um anschließend auf die Detektionsblende fokussiert zu werden, hinter der sich die Detektoren befinden. Detektionslicht, das nicht direkt aus der Fokusregion stammt, nimmt einen anderen Lichtweg und passiert die Detektionsblende nicht, so dass man eine Punktinformation erhält, die durch  
20 sequentielles Abtasten des Objekts zu einem dreidimensionalen Bild führt. Meist wird ein dreidimensionales Bild durch schichtweise Bilddatennahme erzielt, wobei die Bahn des Abtastlichtstrahles auf bzw. in dem Objekt idealer Weise einen Mäander beschreibt. (Abtasten einer Zeile in x-Richtung bei konstanter y-Position, anschließend x-Abtastung anhalten und per y-  
25 Verstellung auf die nächste abzutastende Zeile schwenken und dann, bei konstanter y-Position, diese Zeile in negative x-Richtung abtasten u.s.w.). Um eine schichtweise Bilddatenaufnahme zu ermöglichen, wird der Probenstisch oder das Objektiv nach dem Abtasten einer Schicht verschoben und so die nächste abzutastende Schicht in die Fokusebene des Objektivs gebracht.

30 Eine spektrale Beeinflussung von Lichtpulsen durch Amplituden- und/oder Phasenmodulation ist aus der Literatur, z. B. aus Rev. of Scientific

Instruments 71 (5) p.1929-1960 bekannt. Meist wird die spektrale Veränderung der Laserpulse zur Verkürzung der Pulse, ihrer optimalen Formung oder zur Steuerung optisch induzierter Prozesse verwendet.

5      Nachteilig bei den genannten Verfahren ist, dass hohe Lichtleistungen erforderlich sind, was einerseits große Anforderungen an die Lichtquelle stellt und andererseits zu ungewollten Schädigungen der Probe, beispielsweise durch Bleichen, führt.

10      Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Mikroskopie vorzuschlagen, das zuverlässig und effizient bei verminderter Probenschädigung eine Ausnutzung von nichtlinearen Prozessen ermöglicht.

Die Aufgabe wird durch ein Verfahren gelöst, das durch folgende Schritte gekennzeichnet ist:

- Erzeugen von gepulstem Beleuchtungslicht, das Wellenlängen aufweist, die in einem Spektralbereich liegen,
- 15      • Festlegen eines Detektionsspektralbereichs, der innerhalb des Spektralbereichs liegt,
- Beeinflussen der Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen,
- Beleuchten einer Probe mit dem Beleuchtungslicht,
- 20      • Detektieren des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes innerhalb des Detektionsspektralbereichs.

25      Es ist außerdem eine Aufgabe der Erfindung, ein Mikroskop anzugeben, mit dem zuverlässig und effizient eine Untersuchung einer Probe unter Ausnutzung nichtlinearer Prozesse bei verminderter Probenbelastung ermöglicht ist.

Diese Aufgabe wird durch ein Mikroskop gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, dass der Detektionsspektralbereich innerhalb des Spektralbereichs liegt und dass das Beleuchtungslicht kein Licht aus dem Detektionsspektralbereich mit denselben Polarisations-eigenschaften beinhaltet.

Die Erfindung hat den Vorteil, dass das erfindungsgemäße Verfahren ortsabhängige optische Nichtlinearitäten ausnutzt, jedoch mit deutlich kleineren Lichtintensitäten auskommt, wobei der Einsatz möglichst geringer Lichtintensitäten - insbesondere für biologische Proben - besondere  
5 Bedeutung hat. Außerdem ist die Untersuchung der Probe in großer Probentiefe möglich.

Die Idee des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, aus dem Spektrum ultrakurzer Laserpulse (d. h. vorzugsweise Pikosekunden- und Femtosekundenlaserpulse) gewisse spektrale Anteile - nämlich die aus dem  
10 Detektionsspektralbereich - zu beeinflussen, das so präparierte Beleuchtungslicht auf ein Probenvolumen zu fokussieren und das hierbei im Bereich der zuvor entfernten spektralen Anteile durch nichtlineare Prozesse entstandene Detektionslicht praktisch untergrundfrei zu detektieren. Die Leistung und eventuell spektrale Verteilung dieses Detektionslichts wird für die  
15 Bildgebung verwendet.

In einer bevorzugten Ausführung ist das Beeinflussen ein Entfernen der Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen. In einer anderen Ausführung beinhaltet das Beeinflussen ein Verändern des Polarisationszustandes der Lichtanteile  
20 des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen. Das Verändern des Polarisationszustandes kann insbesondere eine Drehung einer Linearpolarisation umfassen. Durch Drehung der Linearpolarisationsrichtung ist das Detektionslicht im Detektionsspektralbereich von dem  
25 Beleuchtungslicht unterscheidbar.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausführung umfasst das Beeinflussen eine spektrale Filterung. Hierzu ist in einer Ausführungsform ein spektraler Filter vorgesehen, der die Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen, aus dem  
30 Beleuchtungslicht entfernt. Das Beleuchtungslicht beinhaltet in dieser Ausführungsform kein Licht aus dem Detektionsspektralbereich. In einer anderen Variante ist ein spektraler Filter vorgesehen, der den

Polarisationszustand der Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen, verändert.

Durch die spektrale Filterung werden aus dem Spektrum des Beleuchtungslichts bestimmte Frequenzbereiche entfernt, um dort ein  
5 spektrales Fenster zu besitzen, in dessen Innerem sich infolge nichtlinearer Prozesse entstandenes Detektionslicht untergrundfrei detektieren lässt.

In einer bevorzugten Ausgestaltung ist ein weiterer spektraler Filter vorgesehen, der nur Licht der Wellenlängen des Detektionsspektralbereichs zum Detektor gelangen lässt. Vorzugsweise ist der weitere spektrale Filter  
10 zum spektralen Filter invers.

In einer Variante wird das Beleuchtungslicht schon so erzeugt, dass der Detektionsspektralbereich innerhalb des Spektralbereichs liegt und dass das Beleuchtungslicht kein Licht aus dem Detektionsspektralbereich beinhaltet. Der Detektionsspektralbereich bzw. die Detektionsspektralbereiche können  
15 beispielsweise die Spektrallücken zwischen den äquidistanten Moden eines modenverkoppelten PulsLasers sein.

In einer ganz besonders bevorzugten Ausgestaltung ist das Mikroskop ein Scanmikroskop, insbesondere ein konfokales Scanmikroskop.

In der Zeichnung ist der Erfindungsgegenstand schematisch dargestellt und  
20 wird anhand der Figuren nachfolgend beschrieben, wobei gleich wirkende Elemente mit denselben Bezugszeichen versehen sind. Dabei zeigen:

- Fig. 1 Ein erfindungsgemäßes Mikroskop,
- Fig. 2 Masken für spektrale Filter,
- Fig. 3 ein weiteres erfindungsgemäßes Mikroskop,
- 25 Fig. 4 ein weiteres erfindungsgemäßes Mikroskop,
- Fig. 5 ein weiteres erfindungsgemäßes Mikroskop,
- Fig. 6 ein weiteres erfindungsgemäßes Mikroskop.

Fig. 1 zeigt schematisch ein erfindungsgemäßes Mikroskop, das als

Scanmikroskop ausgeführt ist. Die optischen Bauteile zur Führung, Lenkung und Fokussierung des Beleuchtungslichtstrahls 1, der von einem Puls laser 7 erzeugt wird und des Detektionslichtstrahls 3, sowie die Vorrichtungen zur Auswertung der Detektionslichtdaten und zur Anzeige eines Abbildes der Probe sind der besseren Übersichtlichkeit wegen nicht gezeigt. Diese Bauteile sind dem Fachmann hinlänglich bekannt.

Das Mikroskop beinhaltet einen spektralen Filter 5, der die Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen, aus dem Beleuchtungslichtstrahl 1 entfernt. Hierzu wird das Licht räumlich spektral mit einem ersten Gitter 9 aufgespalten und anschließend mit der ersten Linse 11 auf eine Maske 13 fokussiert, die die spektralen Anteile entfernt, die innerhalb der Detektionsspektralbereiche liegen. Das Gitter 9 und die erste Maske 13 befinden sich in den Brennebenen der Linse 11 in einer 4f-Anordnung. Die Maske 13 weist transparente und undurchsichtige Bereiche auf. Sie kann als statische Maske oder aber auch als dynamisch ansteuerbare Maske (Flüssigkristalldisplay, Klappspiegelarray etc.) ausgeprägt sein. Nach der ersten Maske 13 werden die unterschiedlichen spektralen Anteile des Beleuchtungslichts durch eine symmetrische Anordnung aus einer zweiten Linse 15 und zweitem Gitter 17 wieder zu einem gemeinsamen Beleuchtungslichtstrahl 1 zusammengeführt. Dieser Beleuchtungslichtstrahl wird nun in den Mikroskopstrahlengang eingekoppelt und von einem Objektiv 19 auf die zu untersuchende Probe 21 fokussiert. Das Mikroskop scannt z. B., indem einer oder mehrere Spiegel im Strahlengang als Scanspiegel ausgeführt sind und/oder durch bewegen des Probenstischs. Im Innern der Probe 21 am Ort des Fokus des Beleuchtungslichtstrahls 1 finden nun nichtlineare Prozesse wie Selbstphasenmodulation, Continuum Generation etc. statt, bei denen neue Lichtfrequenzen erzeugt werden, welche sich unter anderem auch in den durch die vorherige Blende ausgefilterten Bereichen befinden können. Nach dem Probendurchgang wird das von der Probe 21 ausgehende Detektionslichtstrahl 3 mit einem Kondensor 23 kollimiert zu einem weiteren spektralen Filter 25 gelenkt. Der weitere spektrale Filter 25 ist

zu dem spektralen Filter 5, der von dem Beleuchtungslichtstrahl 1 durchlaufen ist, invers ausgeführt; d. h. wo vorher Licht durchkam, wird jetzt das Licht geblockt. Er enthält eine dritte Linse 29 und eine vierte Linse 31, sowie ein drittes Gitter 33 und ein viertes Gitter 35; außerdem eine zweite Maske 37, die zur ersten Maske 13 invers ist. Hierdurch werden die noch im Detektionslichtstrahl 3 vorhandenen Anteile des Beleuchtungslichtstrahles 1 herausgefiltert, so dass letztendlich beim Detektor 27 nur noch im Probenfokus entstandenes Detektionslicht ankommt. Die Leistung dieses Lichts gibt u.a. Auskunft über die nichtlinearen Brechungsindizes im Probenfokus, welche von den lokalen Gegebenheiten in der Probe 21 abhängen, und ist deshalb bei Scannen des Fokus über die Probe 21 als Signal für bildgebende Verfahren geeignet.

Die Abbildung 2 zeigt verschiedene räumliche erste Masken 13 und zweite Masken 37, die in dem ersten spektralen Filter 5 bzw. in dem zweiten spektralen Filter 25 eingesetzt werden können, wobei die zweiten Masken 37 zu den ersten Masken 13 invers sind. Die transmittierenden Bereiche können noch zusätzlich eingeschränkt werden.

Fig. 3 zeigt ein weiteres erfindungsgemäßes Mikroskop. Es entspricht in Bezug auf die Beleuchtung analog zu dem in Fig. 1 gezeigten Scanmikroskop; bei der Detektion sind mehrere Detektoren 39, 41, 43, 45 vorgesehen, die hinter der zweiten Maske 37 angeordnet sind. Es könnte auch ein Zeilendetektor oder ein Array von Detektoren (z.B. CCD) verwendet werden. Auf die mehreren einzelnen Detektoren 39, 41, 43, 45 fallen nach der spektralen Aufspaltung mit dem Gitter 33 die Anteile des Detektionslichtstrahls 3, die dieselben Wellenlängenbereich aufweisen, wie die Anteile des Beleuchtungslichtstrahles 1, die durch die erste Maske 13 entfernt wurden. In einer besonders einfachen Anordnung lässt sich hierbei auch auf die Maske selbst verzichten. Man erhält durch Verwendung der mehreren Detektoren 39, 41, 43, 45 zusätzliche Informationen darüber, mit welcher Stärke die nichtlinearen Prozesse in den unterschiedlichen spektralen Bereichen auftreten, was sich evtl. für eine differenziertere Bildgebung nutzen lässt.

Es ist auch möglich, für den zweiten spektralen Filter 25 zumindest teilweise

dieselben optischen Elemente zu nutzen, wie für den ersten spektralen Filter 13 indem man den Lichtstrahl zumindest teilweise ein zweites Mal über sie führt.

Fig. 4 zeigt ein weiteres erfindungsgemäßes Mikroskop. Statt der Gitter 9, 17, 33, 35 werden ein erstes Prisma 47, ein zweites Prisma 49, ein drittes Prisma 51 und ein viertes Prisma 53 zum spektralen Aufspalten bzw. Vereinigen verwendet. Der von dem Puls laser 7 erzeugte Beleuchtungslichtstrahl 1 ist linear polarisiert. Die Maske 13 dreht die Polarisationsrichtung der Anteile des Beleuchtungslichtstrahles 1, die Wellenlängen aus den Detektionsbereichen aufweisen, um 90 Grad. Die Polarisationsbeeinflussung erfolgt durch eine geeignet strukturierte und ausgerichtete doppelbrechende feste Maske 13 (z. B. strukturiertes  $\lambda/2$ -Plättchen) oder auch durch eine dynamisch angesteuerte Maske 13, welche beispielsweise durch ein Flüssigkristalldisplay realisiert werden kann. Nach dem Probendurchgang wird das von der Probe ausgehende Detektionslicht durch einen zweiten spektralen Filter 25 so gefiltert, dass das Beleuchtungslicht, dessen Polarisation von dem ersten spektralen Filter 5 nicht gedreht wurde, vollständig entfernt wird. Dies geschieht dadurch, dass in dem zweiten spektralen Filter 25 über eine geeignete zweite Maske 37 der Polarisationszustand der unterschiedlichen spektralen Anteile so verändert wird, dass alle Anteile, die direkt aus dem Puls laser 7 stammen, wieder eine gemeinsame Polarisation erhalten, welche durch einen nachfolgenden Polarisator 55 aus dem Strahlengang entfernt wird. Im konkreten Ausführungsbeispiel werden in dem zweiten spektralen Filter 25 diejenigen spektralen Anteile nochmals in der Polarisation um 90° gedreht, die bereits in dem ersten spektralen Filter 25 eine Polarisationsänderung erfahren haben. Durch den Polarisator 55 werden dann alle spektralen Anteile aus dem Strahl entfernt, die eine Polarisation von 0° besitzen. Im Strahlengang befindet sich dann in der Regel nur noch Licht, das in der Probe durch nichtlineare Prozesse entstanden ist und dessen Intensität Aussagen über die lokalen nichtlinearen Brechungsindizes der Probe im Fokus zulässt und sich daher zur Bildgebung eignet. Man kann auch bei diesem Ausführungsbeispiel auf einige Teile des zweiten spektralen Filters 25

verzichten, wie z. B. die vierte Linse 31 und das vierte Prisma 53, wenn man z. B. den oder die Detektoren mit Polarisatoren versieht und direkt hinter der Maskenebene 25 anordnet.

Abbildung 5 zeigt eine besonders geschickte Ausführungsform, bei der das je  
5 nach Wellenlänge in 0° oder 90°-Richtung polarisierte Licht vor der Probe mit  
Hilfe eines Polarisationssteilers 57 aufgespalten wird, wonach die beiden  
Lichtanteile des Beleuchtungslichtstrahles 1 aus gegenläufigen Richtungen auf  
die Probe 21 von einem ersten Objektiv 59 und einem weiteren Objektiv 61  
fokussiert werden. Hierbei ist jeweils das Objektiv für die eine  
10 Polarisationsrichtung gleichzeitig der Kondensor für die andere  
Polarisationsrichtung. Nach Probendurchgang und Durchgang durch einen  
Polarisationsdreher 62 (Diese Nummer ist schon für das 2. Objektiv vergeben,  
auch im Bild), der als  $\lambda/2$ -Plättchen 63, das vorzugsweise die Polarisation um  
90° dreht, ausgeführt ist, werden die beiden Lichtanteile des Detektionslichtes  
15 über den Polarisationsstrahlteiler zusammengeführt, wobei das durch die  
Probe unbeeinflusste Licht vom später zu detektierenden Licht durch den  
Polarisationsstrahlteiler 57 so abgetrennt wird, dass nur das in der Probe neu  
entstandene Licht im Detektor 27 detektiert wird.

Im Ausführungsbeispiel in Abbildung 6 wurde auf den ersten spektralen Filter  
20 verzichtet. Das Licht des PulsLasers 7 setzt sich aus sehr dicht liegenden  
Linien zusammen. Dies ist als Effekt der Modenkopplung bei vielen der  
üblichen Pikosekunden- und Femtosekundenlaser der Fall. Der spektrale  
Linienabstand entspricht hier meist der Pulsfrequenz des entsprechenden  
Lasers; so setzt sich z. B. das Spektrum eines mit der Repetitionsrate 80MHz  
25 pulsierenden Titan-Saphir-Femtosekundenlasers aus einzelnen spektralen  
Linien im spektralen Abstand von 80MHz zusammen. Zwischen den einzelnen  
spektralen Linien befinden sich Lücken im Spektrum, so dass das Spektrum  
dieses PulsLasers 7 den gefilterten Spektren der zuvor behandelten  
Ausführungsbeispiele ähnelt. Finden sich nach Durchgang eines solchen  
30 Anregungslasers durch die Probe 21 Anteile in diesen spektralen Bereichen,  
so ist dies auf nichtlineare Prozesse zurückzuführen, was wie in den  
vorhergehenden Ausführungsbeispielen zur Bildgebung genutzt werden kann.

Die Trennung des durch nichtlineare Prozesse entstandenen Detektionslichtes vom Anregungslicht kann wie in den vorhergehenden Ausführungsbeispielen durch räumliche Filterung geschehen, wobei in diesem Zusammenhang natürlich auch der Einsatz von Monochromatoren etc. eine räumliche Filterung darstellt. Alternativ und besonders bevorzugt ist als zweiter spektralen Filter ein Etalon 63 ein verwendet, welches durch einen ersten Spiegel 65 und einen zweiten Spiegel 67 gebildet ist und welches alle spektralen Komponenten in einem bestimmten Wellenlängenabstand aus dem Detektionslichtstrahl 3 entfernt (was auch in den vorhergehenden Ausführungsbeispielen bei geeignetem ersten spektralen Filter möglich ist). Im Fall des modengekoppelten Lasers muss der spektrale Abstand, in dem das Etalon 63 Licht absorbiert, gerade dem spektralen Abstand der einzelnen Lasermodes entsprechen, was im wesentlichen bedeutet, dass die Länge des Etalons 63 der effektiven Resonatorlänge des modengekoppelten Lasers angepasst sein muss. Da die Etalonlänge für die derzeit üblichen Kurzpulslaser relativ groß ist, wird in der Regel das Etalon 63 als Resonator aus im wesentlichen zwei teildurchlässigen Spiegeln 65, 67 im Abstand der effektiven Resonatorlänge ausgeführt sein. Im Innern des Resonators wird sich zweckmäßigerweise ein ansteuerbares Element 69 befinden, mit dessen Hilfe sich die effektive Resonatorlänge regeln lässt, um eine genaue Anpassung vorzunehmen und Drifts beispielsweise infolge thermischer Längenausdehnung ausregeln zu können. Ein solches Element könnte aus Materialien bestehen, dessen Brechungsindex sich extern ansteuern lässt, z. B. aus Flüssigkristallen oder ferroelektrischen Kristallen. Auch könnte eine entsprechende Regelung der Resonatorlänge des Etalons über einen beweglichen Endspiegel erfolgen. Natürlich kann auch anstelle der Resonatorlänge des Etalons auch die Länge des Kurzpulslaser-Resonators geregelt werden.

Die Erfindung wurde in Bezug auf eine besondere Ausführungsform beschrieben. Es ist jedoch selbstverständlich, dass Änderungen und Abwandlungen durchgeführt werden können, ohne dabei den Schutzbereich der nachstehenden Ansprüche zu verlassen.

**Bezugszeichenliste:**

	1	Beleuchtungslichtstrahl
	3	Detektionslichtstrahl
5	5	spektraler Filter
	7	Pulslaser
	9	erstes Gitter
	11	erste Linse
	13	erste Maske
10	15	zweite Linse
	17	zweites Gitter
	19	Objektiv
	21	Probe
	23	Kondensor
15	25	weiterer spektraler Filter
	27	Detektor
	29	dritte Linse
	31	vierte Linse
	33	drittes Gitter
20	35	viertes Gitter
	37	zweite Maske
	39	Detektor
	41	Detektor
	43	Detektor
25	45	Detektor

	47	erstes Prisma
	49	zweites Prisma
	51	drittes Prisma
	53	viertes Prisma
5	55	Polarisator
	57	Polarisationsteiler
	61	weiteres Objektiv
	62	Polarisationsdreher
	63	$\lambda/2$ -Plättchen
10	65	erster Spiegel
	67	zweiter Spiegel
	69	ansteuerbares Element

Patentansprüche

1. Verfahren zur Mikroskopie gekennzeichnet durch folgende Schritte:
- 5 • Erzeugen von gepulstem Beleuchtungslicht, das Wellenlängen aufweist, die in einem Spektralbereich liegen,
  - Festlegen eines Detektionsspektralbereichs, der innerhalb des Spektralbereichs liegt,
  - Beeinflussen der Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen,
  - 10 • Beleuchten einer Probe mit dem Beleuchtungslicht,
  - Detektieren des von der Probe ausgehenden Detektionslichtes innerhalb des Detektionsspektralbereichs.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Beeinflussen ein Entfernen der Lichtanteile des Beleuchtungslichts ist, die
- 15 Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Beeinflussen ein Verändern des Polarisationszustandes der Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen, beinhaltet.
- 20 4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Verändern des Polarisationszustandes eine Drehung einer Linearpolarisation umfasst.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Beeinflussen eine spektrale Filterung umfasst.
- 25 6. Verfahren zur Mikroskopie, wobei eine Probe mit gepulstem Beleuchtungslicht, das Licht aus einem Spektralbereich aufweist, beleuchtet wird und von der Probe ausgehendes Detektionslicht in einem

Detektionsspektralbereich detektiert wird, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektionsspektralbereich innerhalb des Spektralbereichs liegt und dass das Beleuchtungslicht kein Licht aus dem Detektionsspektralbereich beinhaltet.

5 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass ein Puls laser zum Erzeugen des gepulsten Beleuchtungslichts vorgesehen ist.

10 8. Mikroskop mit einer Lichtquelle zur Erzeugung von gepulstem Beleuchtungslicht, das Licht aus einem Spektralbereich aufweist, und mit mindestens einem Detektor zum Detektieren des von einer Probe ausgehenden Detektionslichtes in einem Detektionsspektralbereich, dadurch gekennzeichnet, dass der Detektionsspektralbereich innerhalb des Spektralbereichs liegt und dass das Beleuchtungslicht kein Licht aus dem Detektionsspektralbereich mit denselben Polarisations-eigenschaften beinhaltet.

15 9. Mikroskop nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Beleuchtungslicht kein Licht aus dem Detektionsspektralbereich beinhaltet.

20 10. Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein spektraler Filter vorgesehen ist, der den Polarisationszustand der Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen, verändert.

11. Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass ein spektraler Filter vorgesehen ist, der die Lichtanteile des Beleuchtungslichts, die Wellenlängen innerhalb des Detektionsspektralbereichs aufweisen, aus dem Beleuchtungslicht entfernt.

25 12. Mikroskop nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass ein weiterer spektraler Filter vorgesehen ist, der nur Licht der Wellenlängen des Detektionsspektralbereichs zum Detektor gelangen lässt.

13. Mikroskop nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass der weitere spektrale Filter zum spektralen Filter invers ist.

30 14. Mikroskop nach einem der Ansprüche 8 bis 13, dadurch

gekennzeichnet, dass das Mikroskop ein Scanmikroskop oder ein konfokales Scanmikroskop ist

### Zusammenfassung

Die Erfindung offenbart ein Verfahren zur Mikroskopie, wobei eine Probe mit gepulstem Beleuchtungslicht, das Licht aus einem Spektralbereich aufweist, beleuchtet wird und von der Probe ausgehendes Detektionslicht in einem

5 Detektionsspektralbereich detektiert wird. Das Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, dass der Detektionsspektralbereich innerhalb des Spektralbereichs liegt und dass das Beleuchtungslicht kein Licht aus dem Detektionsspektralbereich oder zumindest nicht mit denselben Polarisations-eigenschaften beinhaltet. Außerdem ist ein Mikroskop offenbart.

10

Fig. 1

15

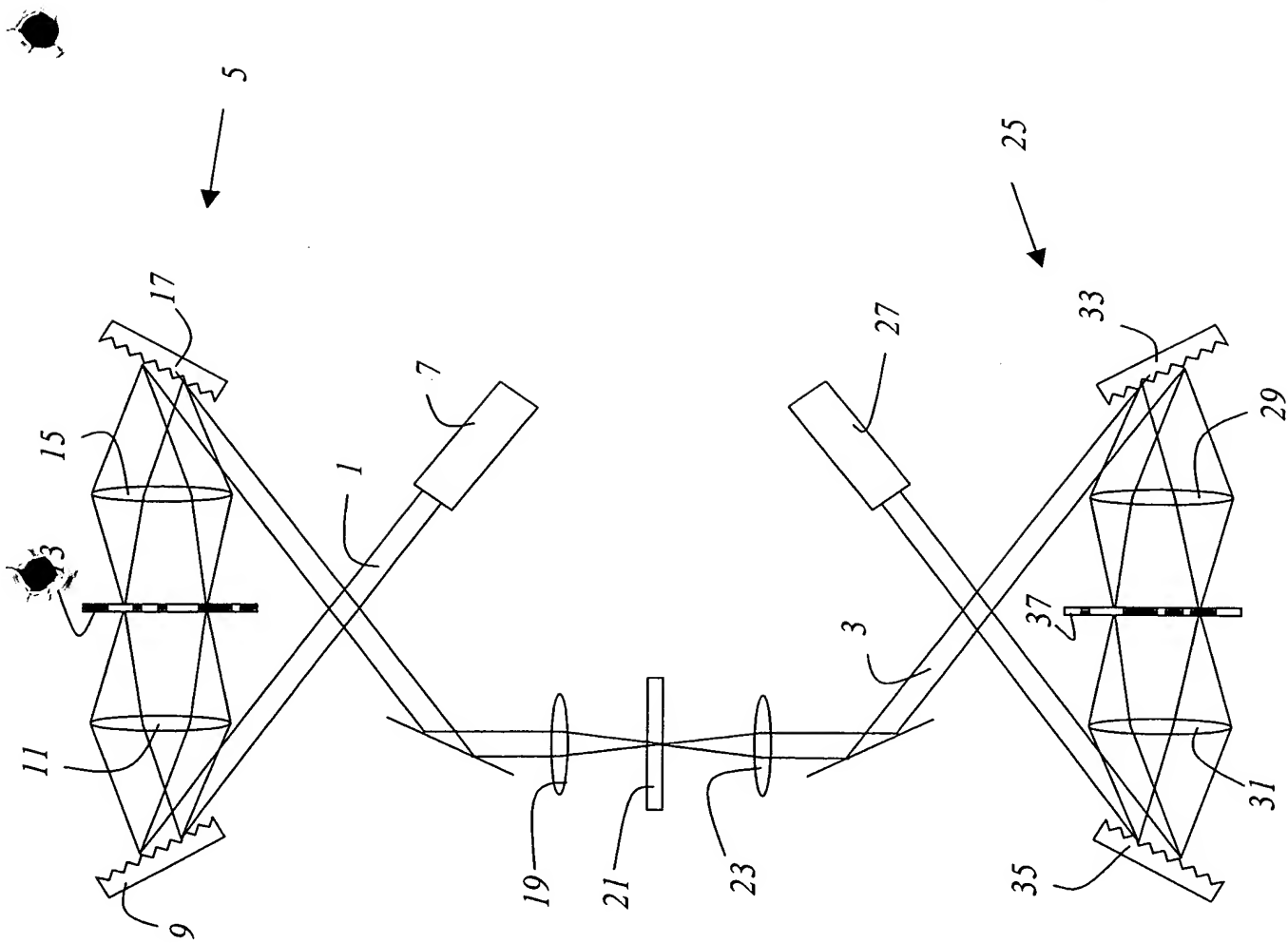
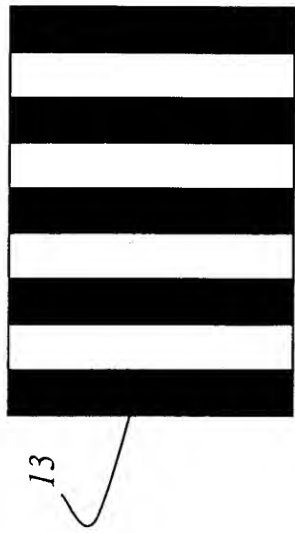
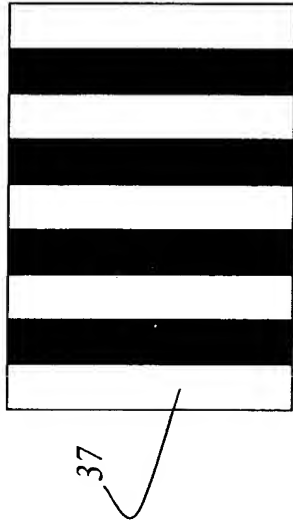


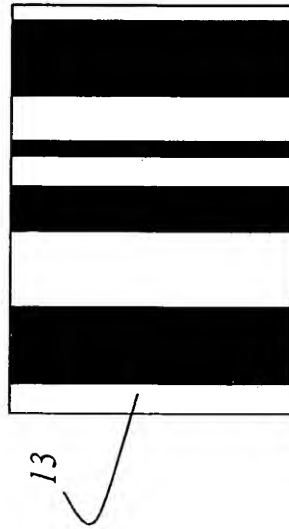
Fig. 1



**Fig. 2a**



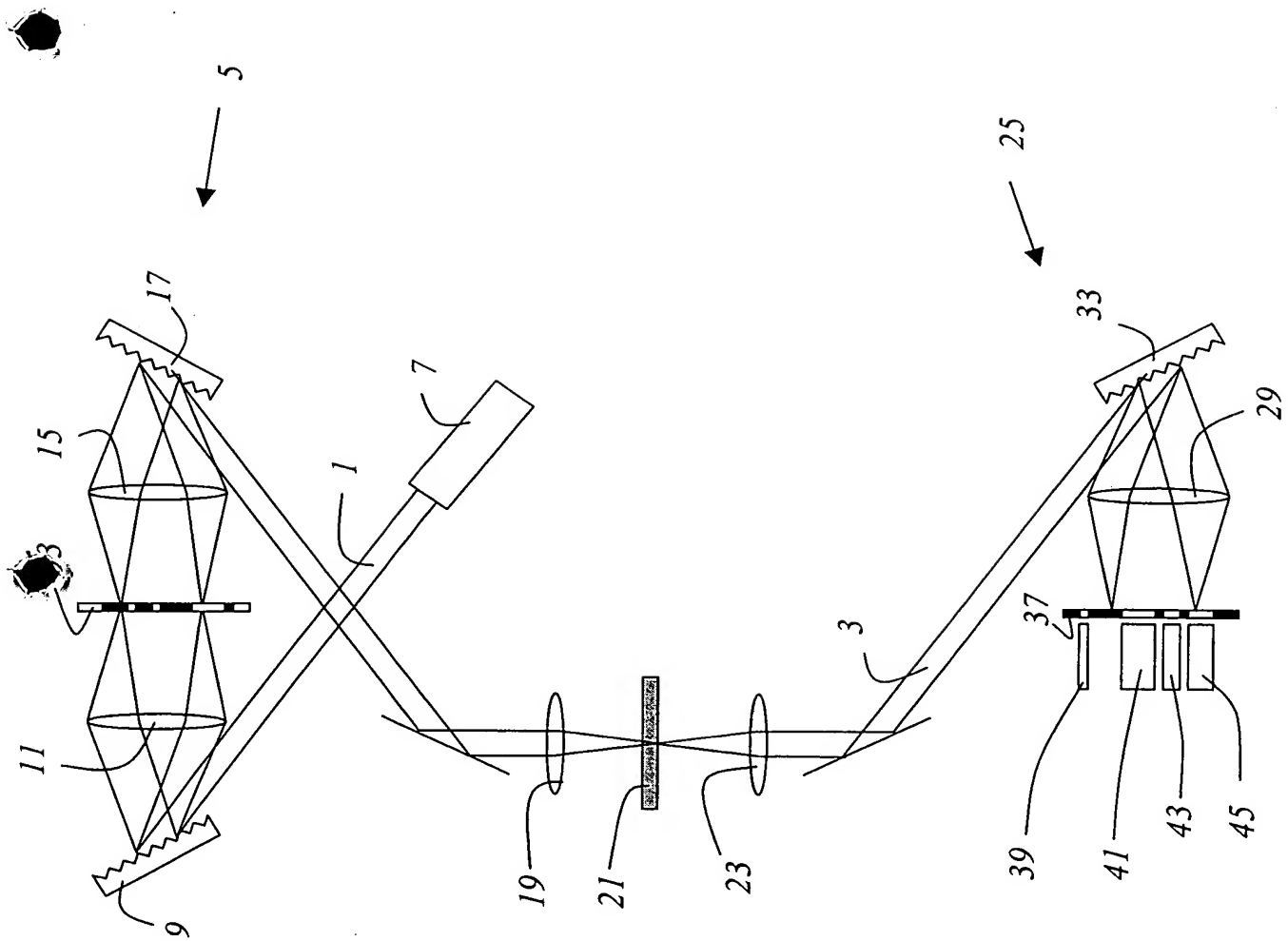
**Fig. 2b**



**Fig. 2c**



**Fig. 2d**



**Fig. 3**

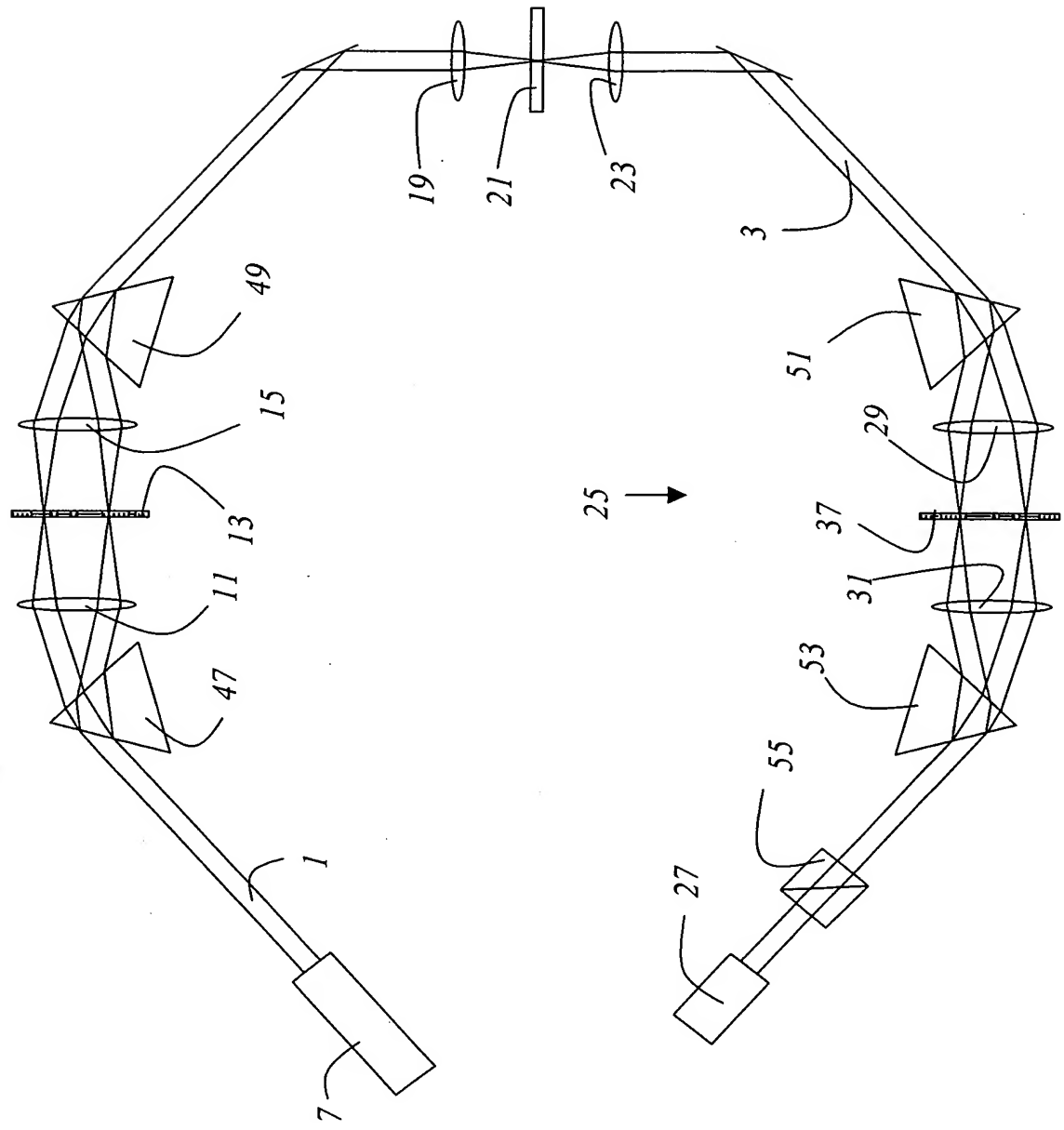


Fig. 4

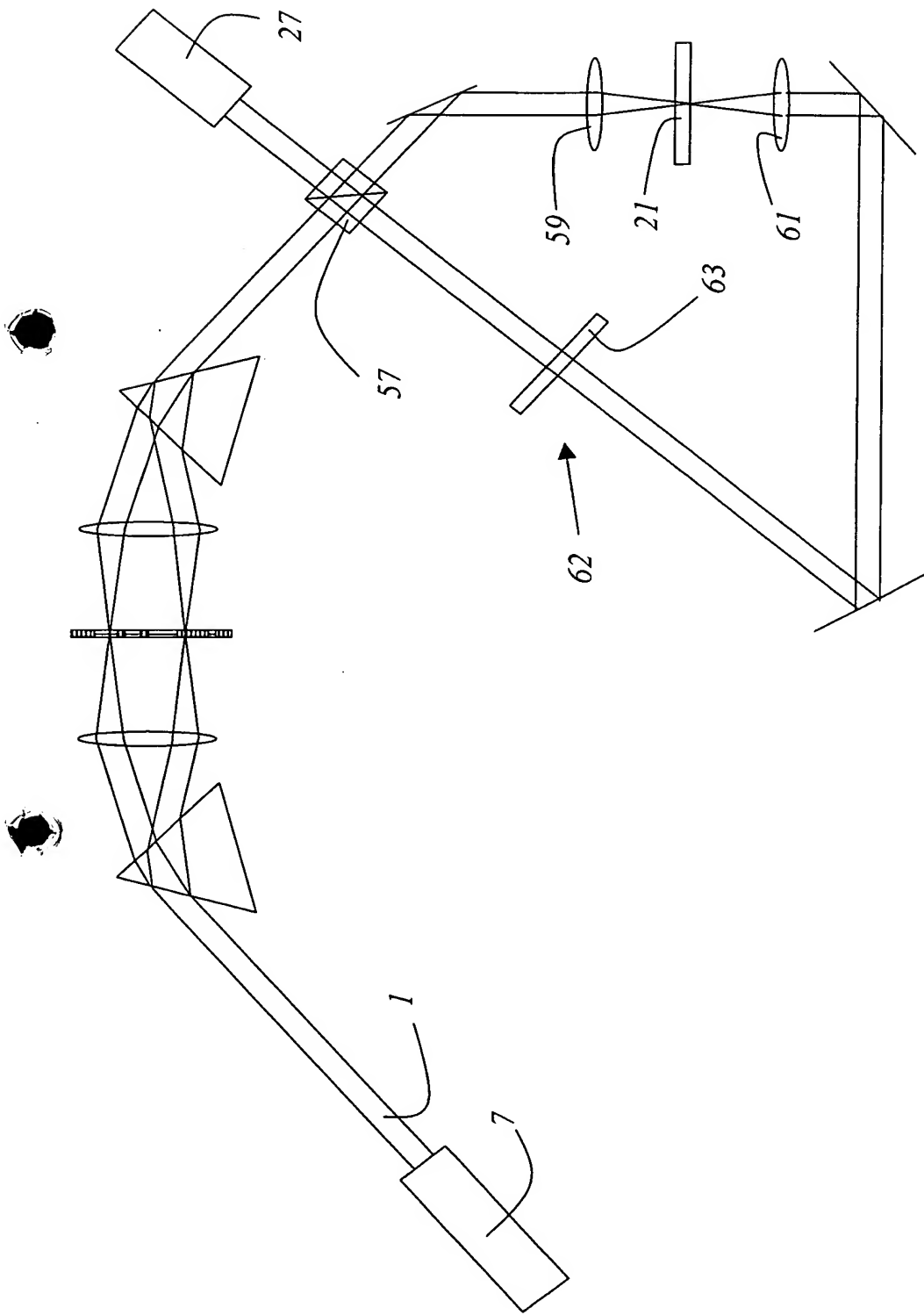


Fig. 5

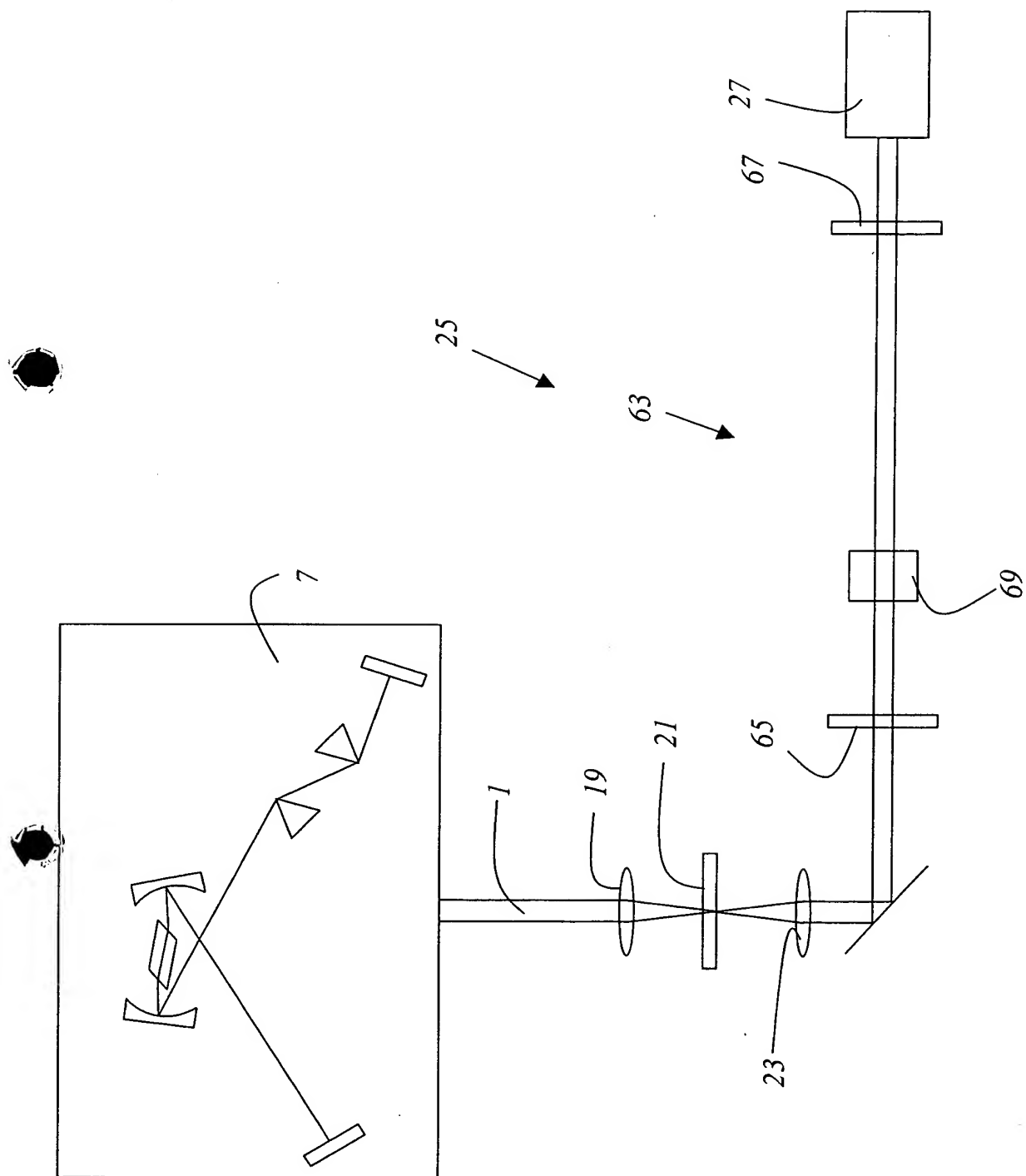


Fig. 6